

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat penelitian *true eksperimental* dengan desain penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design* untuk mengetahui pengaruh fraksi kloroform herba Ciplukan (*Physalis angulata L.*) pada sebagai pencegahan kerusakan fotoreseptor tikus putih (*Rattus Norvegicus Strain Wistar*) model diabetik diinduksi STZ 60 mg/KgBB.

#### 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Tempat dilaksanakannya penelitian adalah di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang Jalan Bendungan Sutami 188 A Malang, Jawa Timur. Waktu penelitian ini direncanakan pada bulan Januari sampai Maret tahun 2018.

#### 4.3 Populasi dan Sampel

##### 4.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah hewan coba berupa tikus putih jantan *Rattus norvegicus*, strain wistar yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik FK UMM.

##### 4.3.2 Sampel

Sampel dari penelitian ini adalah hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, strain Wistar, umur 8-10 minggu dengan berat badan 150-200 gram dan kondisi sehat.

#### 4.3.3 Besar Sampel

Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan yaitu satu kelompok control positif (+), kontrol negatif (-), dan tiga kelompok perlakuan. Replikasi penelitian yang digunakan sesuai dengan rumus Federer dalam Purnamasari, M. R. *et al.*, 2017:

$$(t-1) (p-1) \geq 15$$

$$(t-1) (5-1) \geq 15$$

$$(t-1) 4 \geq 15$$

$$t-1 \geq 3,75$$

$$t \geq 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5 ekor untuk setiap kelompok)}$$

Keterangan:

p = kelompok

t = jumlah replikasi per kelompok

Selanjutnya besar sampel ditentukan dengan nilai E (Charan dan Kantharia, 2013).

$$\begin{aligned} E \text{ (Resource Equation) (besar sampel)} &= \Sigma \text{ hewan} - \Sigma \text{ kelompok perlakuan} \\ &= 25 - 5 \\ &= 20 \text{ ekor} \end{aligned}$$

Rumus besar sampel untuk mengantisipasi kemungkinan sampel terpilih mengalami *drop out* (Saryono, 2011) sebagai berikut:

$$n' = [n/1-f]$$

$$n' = 5 / (1-0,1)$$

$$n' = 5.55 \text{ (dibulatkan menjadi 6)}$$

$$n' = 6 - 5$$

$$n' = 1$$

$$n' = 1 \text{ ekor}$$

Keterangan:

$n'$  = jumlah sampel penelitian

$n$  = besar sampel yang dihitung

$f$  = perkiraan proporsi *drop out*, kira-kira 10% ( $f = 0,1$ )

Setelah dimasukkan rumus replikasi Frederer, dilanjutkan dengan rumus *Resource Equation Method* sehingga dibutuhkan 20 ekor tikus untuk penelitian ini. Ditambah dengan jumlah sampel cadangan sebanyak 10% ( $f=0,1$ ) dari total sampel sehingga diperoleh 1 ekor tikus untuk cadangan masing-masing kelompok. Jadi total sampel tikus yang dibutuhkan beserta cadangan adalah 25 ekor tikus dibagi ke dalam 5 kelompok yang berarti 1 kelompok terdiri dari 4 ekor tikus dan 1 ekor tikus cadangan.

#### 4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel yang dilakukan peneliti dipilih dengan menggunakan teknik *purposive sampling*, kriteria yang dipilih yaitu tikus putih *strain wistar* jantan umur 8-10 minggu dengan berat badan 150-200 gram, serta tikus dalam keadaan sehat yang memiliki ciri-ciri yaitu gerakan aktif, bulu tebal putih, mata jernih dan tidak cacat. Kemudian, tikus akan dikelompokkan sesuai dengan perlakuan masing-masing.

#### 4.3.5 Karakteristik Sampel Penelitian

- a. Kriteria Inklusi: Tikus putih *strain wistar* jantan umur 8-10 minggu dengan berat badan 150-200 gram. Tikus sehat (gerakan aktif, bulu tebal putih, mata jernih dan tidak cacat).

b. Kriteria eksklusi: Tikus yang mati saat penelitian berlangsung.

#### 4.3.6 Variabel Penelitian

4.3.6.1 Variabel bebas : Dosis Fraksi Kloroform Herba (*Physalis angulata L.*).

4.3.6.2 Variabel tergantung : Kerusakan fotoreseptor tikus putih (*Rattus Norvegicus Strain Wistar*) yang diinduksi *Streptozotocin*.

#### 4.3.7 Definisi Operasional Variabel Penelitian.

##### 1. Fraksi Kloroform tanaman Ciplukan (*Physalis Angulata L.*).

Tanaman Ciplukan (*Physalis angulata L.*) yang diperoleh dari Materia Medika Batu. Bagian ciplukan yang digunakan untuk fraksi diambil dari seluruh bagian tanaman ciplukan, dibuat dengan maserasi dengan etanol 70% kemudian kloroform-metanol (3:1) sebanyak 3 kali lalu diuapkan menggunakan *rotatoryevaporator*, sehingga didapatkan fraksi kloroform herba ciplukan dibuat dengan etanol 70% dan di frakstraksi dengan kloroform-metanol (3:1) sebanyak 3 kali, sehingga diperoleh fraksi kloroform tanaman Ciplukan dengan dosis 0,91 mg/2 ml, 1,82 mg/2 ml, dan 3,64 mg/2 ml (Sediarso, Sunayo H, Amalia N, 2013). Alat ukur yang dipakai gelas ukur, *sputit*, Neraca Analitik. Hasil yang diperoleh Fraksi kloroform tanaman ciplukan diberikan pada 3 kelompok perlakuan dengan dosis 0.91mg/200gBB, 1,82 mg/200ggBB, 3,64 mg/200gBB dalam 2 ml, diberikan secara peroral setiap hari selama 14 hari (Sediarso, Sunayo H, Amalia N, 2013). Skala ukur Ordinal (Kategorik).

##### 2. Kerusakan Fotoreseptor Tikus Putih (*Rattus Norvegicus Strain Wistar*).

Kerusakan fotoreseptor tikus putih diawali adanya hiperglikemia berkepanjangan yang merupakan agen etiologi utama di mikrovaskular. Adanya protein penting terhadap fungsi fotoreseptor setelah hiperglikemia menunjukkan

terjadinya mikroangiopati sehingga menurunkan *Messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) untuk protein *Retinal Pigment Epithelium 65* (RPE65) disertai jaringan parut yang bisa berkontraksi, menarik pinggiran retina dan memaksanya untuk melepaskannya (Mohan, A. J., 2015). Pengukuran dengan Mikroskop, OptiLab Viewer. Hasil ukur yang diperoleh Fotoreseptor diamati meliputi rerata ukuran sepanjang ora serrata area retina pada bagian PRL dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan satuan ukur mikrometer (Shen, J., Bi, Y. dan Das, U. N., 2014). Skala ukur yang dipakai Rasio (Numerik).

#### 4.4 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.4.1 Alat

1. Alat pemeliharaan tikus: kandang tikus, botol air minum tikus, penutup kandang dari anyaman kawat, tempat makan tikus, timbangan untuk mengukur berat badan tikus (Perret-gentil, M. I., 2007).
2. Alat untuk membuat fraksi kloroform herba ciplukan (*Physalis angulata* L.): bak air, pisau / gunting, blender, gelas ukur, corong kaca, pengaduk (*spatula*) kaca, *beaker glass*, alat maserasi, *rotary evaporator* (Sunaryo, Hadi, Kusmardi dan Wahyu Trianingsih, 2012).
3. Alat untuk memberikan perlakuan hewan coba: sarung tangan (*handscoon*), sonde oral 5 ml, *beaker glass*.
4. Alat untuk memberikan STZ: sarung tangan (*handscoon*), *sputit* 1 ml, tabung.
5. Alat pengukur gula darah: *glucometer*, kasa, *mess*, *scalpel*, plester.
6. Alat untuk mengetahui fotoreseptor retina: mikroskop, *scalpel*, *mess*.
7. Alat lain: kamera digital, label, alat tulis.

#### 4.4.2 Bahan

Menurut Aldi, Yufri, Dira dan Yovita Jayanti tahun 2013.

1. Bahan untuk pemeliharaan tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain *wistar*: makanan tikus standar, aquades.
2. Bahan untuk membuat fraksi kloroform herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.): serbuk sebanyak 500gram etanol 80%, asamsulfat 2M, kloroform, methanol, amoniak dan aquadest.
3. Bahan untuk perlakuan:
  - a. Fraksi kloroform herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) yaitu 0,91mg; 1,82 mg; 3,64 mg)/200gramBB/hari selama 2 minggu.
  - b. STZ 60 mg/KgBB tikus i.p *single dose*.

#### 4.5 Prosedur Penelitian

##### 4.5.1 Persiapan dan Pengelompokan Hewan Coba.

Menurut Sediarto, Sunaryo H dan Amalia N tahun 2013. Tikus diadaptasikan terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan standar BR-1 dan minuman aquades. Hal ini bertujuan agar tikus dapat beradaptasi dengan lingkungan baru dan mencegah tikus agar tidak mengalami stress yang dapat berpengaruh pada metabolisme sehingga mengganggu penelitian.

Hewan uji yang digunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, strain Wistar yang dibagi dalam 5 kelompok.

1. Kelompok I (K1) adalah kontrol negatif, diberi pakan BR-1 serta minum aquades untuk mendeskripsikan ukuran normal fotoreseptor pada tikus *Rattus Norvegicus Strain Wistar* namun, tidak dimasukkan dalam uji statistik.

2. Kelompok II (K2) adalah kontrol positif, diberi pakan BR-1 serta minum aquades dan STZ 60 mg/KgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 1.0 ml (0,1 M, pH = 4,5) dosis tunggal secara intraperitoneal.
3. Kelompok III (K3) adalah perlakuan, diberi pakan BR-1 dan minum aquades, kemudian diberi STZ 60 mg/KgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 1.0 ml (0,1 M, pH = 4,5) dosis tunggal secara intraperitoneal serta diberikan fraksi kloroform tanaman ciplukan dengan dosis 0,91mg/200gramBB secara peroral diberikan setiap hari selama 14 hari.
4. Kelompok IV (K4) adalah perlakuan, diberi pakan BR-1 dan minum aquades, kemudian diberi STZ 60 mg/KgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 1.0 ml (0,1 M, pH = 4,5) dosis tunggal secara intraperitoneal serta diberikan fraksi kloroform tanaman ciplukan dengan dosis 1,82 mg/200gramBB secara peroral diberikan setiap hari selama 14 hari.
5. Kelompok V (K5) adalah perlakuan, diberi pakan BR-1 dan minum aquades, kemudian diberi STZ 60 mg/KgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 1.0 ml (0,1 M, pH = 4,5) dosis tunggal secara intraperitoneal serta diberikan fraksi kloroform tanaman ciplukan dengan dosis 3,64 mg/200gramBB secara peroral diberikan setiap hari selama 14 hari.

#### 4.5.2 Induksi STZ

STZ dalam penginduksiannya ke tikus dilarutkan dalam buffer sitrat 1.0 ml (0,1 M, pH = 4,5) dengan dosis 60 mg/KgBB. Kadar glukosa darah diperkirakan setelah 48 jam untuk konfirmasi induksi diabetes yang menunjukkan kelainan metabolik kronis ditandai dengan awalnya hyperglikemia diikuti oleh hiperlipidemia dan peningkatan stres oksidatif. Kadar gula darah di

periksa menggunakan darah vena dari ekor tikus lalu dikonfirmasi GDA > 200 mmHg, lalu dilihat juga pada hari ke 10 mata tikus dalam keadaan buram (Joy, J. M. dan Kumar, G. A., 2011).

#### 4.5.3 Pembuatan Fraksi Herba Ciplukan (*Physalis angulata L.*)

- a) Tanaman ciplukan (*Physalis Angulata L*) yang diperoleh dari Materia Medika Batu.
- b) Tanaman Ciplukan dipanen sebanyak 1,5kg, dipisahkan dari bagian kotorannya, dicuci, ditiriskan, kemudian dikeringkan dan dibuat serbuk.
- c) *Physalis angulata L.* setelah dipanen, dipisahkan dari bagian kotorannya, dicuci, ditiriskan, kemudian dikeringkan dan dibuat serbuk, ditimbang 500gram serbuk.
- d) Serbuk simplisia dihaluskan dengan derajat halus 25/40, diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etanol 70% hingga negatif.
- e) Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* menjadi ekstrak kental.
- f) Ekstrak kental diasamkan dengan asam sulfat 2M dan diekstraksi dengan kloroform.
- g) Lapisan air asam yang dipeoleh dibasakan dengan amonia hingga PH 10.
- h) Diektraksi dengan kloroform-metanol (3:1) sebanyak 3 kali.
- i) Diuapkan dengan *rotary evaporator*.
- j) Dikeringkan pada suhu 50°C.
- k) Didapatkan fraksi kering 64,86 gram.  
(Sunaryo, Hadi, Kusmardi dan Wahyu Trianingsih, 2012).



#### 4.5.4 Dasar Penentuan Dosis

Penentuan dosis yang digunakan dalam penelitian ini mengikuti penelitian terdahulu mengenai fraksi kloroform dari tanaman ciplukan (*Physalis Angulata L*) dengan dosis 0,13 mg/20 gramBB, 0,26mg/20 gramBB, dan 0,52 mg/20 gramBB pada mencit yang terbukti memiliki aktivitas sebagai antidiabetes dengan kandungan senyawa golongan asam lemak tidak jenuh, *Aplysterylacetate* dan *alkaloid Nordextromethorphan* (Sediarso, Sunaryo H dan Amalia N, 2013).

Dari data tersebut kemudian dikonversikan dosis mencit ke tikus dengan menggunakan tabel konversi sehingga dapat diperoleh dosis fraksi tanaman ciplukan menurut hasil konversi dari dosis mencit, dimana berat badan mencit 20gram setara dengan 200gram berat badan tikus dengan satuan konversi = 7,0 (Laurence & Bacharach, 1964). Sehingga dosis fraksi tanaman ciplukan yang diberikan yaitu:

$$\text{Dosis I} = 7,0 \times 0,13 \text{ mg} = 0,91 \text{ mg/200gramBB}$$

$$\text{Dosis II} = 7,0 \times 0,26 \text{ mg} = 1,82 \text{ mg/200gramBB}$$

$$\text{Dosis III} = 7,0 \times 0,52\text{mg} = 3,64\text{mg/200gramBB}$$

Tabel 4.1 Hasil Fraksinasi dan Ekstraksi Herba *Physalis angulata L.*

No.	Keterangan	Jumlah
1	Simplisia segar	15 kg
2	Serbuk simplisia	1,5 kg
3	Ekstrak kental	280 gram
4	Fraksi kental	106 gram
5	Fraksi kering	64,86 gram

(Sunaryo, Hadi, Kusmardi dan Wahyu Trianingsih, 2012).

Pemberian lazim pada mencit adalah 2,0 ml, diberikan setiap hari selama 14 hari (Sediarso, Sunaryo H, Amalia N, 2013). Berikut adalah tabel daftar konversi dosis pada setiap spesies.

	Mencit 20 gram	Tikus 200 gram	Marmot 400 gram	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gram	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200 gram	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmot 400 gram	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1,5 kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2 kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4 kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12 kg	0.008	0.06	0.1	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70 kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1.0

(Laurence dan Bacharach, 1964).

Gambar 4.1 Tabel Konversi Perhitungan Dosis.

#### 4.5.5 Proses Anestesi Hewan Coba

Melakukan anestesi pada tikus dengan menggunakan kloroform, yaitu tikus dimasukkan ke dalam toples yang diberi kloroform yang ditaruh di kapas, setelah itu tikus dimasukkan dan menutup kembali toplesnya, lalu membiarkan sampai tikus tidak bergerak, tunggu selama 20 detik, kemudian tikus diambil lalu dibedah (Perret-gentil, M. I., 2007).

#### 4.5.6 Pembuatan Preparat Fotoreseptor Retina

Setelah dilakukan anestesi, hewan-hewan itu dengan kloroform, mata bagian depan diiris searah garis khatulistiwa lalu vitreous diangkat. Bagian setengah posterior direndam dalam larutan isopentana pada suhu - 70 ° C. Jaringan dipotong yang baru disiram dengan *cryostat* pada - 20 ° C dan dipasang di penutup (Pulido, J. E. *et al.*, 2007).

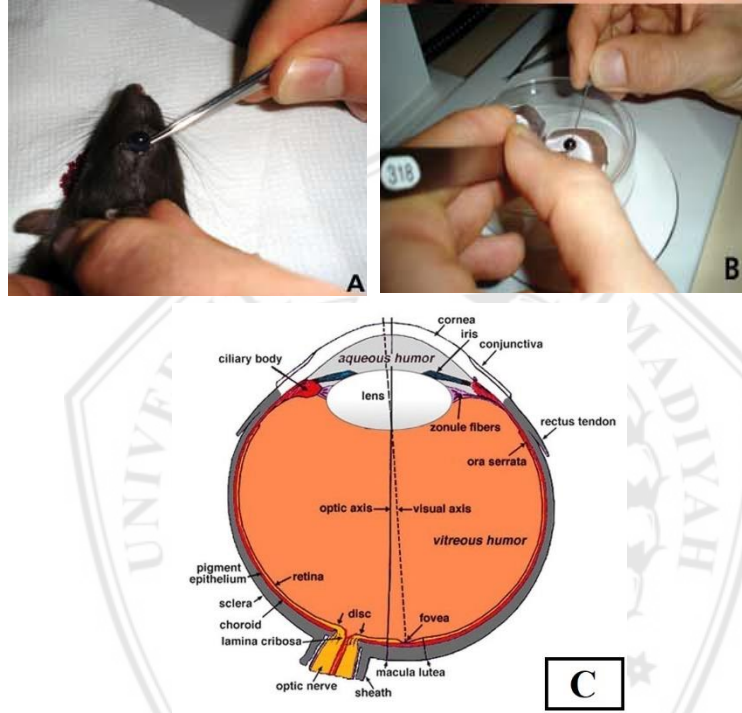
Kemudian jaringan dipotong untuk selanjutnya dilakukan *processing* jaringan dan pengecatan *Hematoxilin-Eosin*.

#### 1. Fiksasi pertama

- a. Dilakukan perendaman terhadap kedua mata didalam larutan formalin 10% dan harus sering digoyang.

- b. Dibiarkan selama 1 minggu pada suhu kamar (25°C).
- c. Satu botol digunakan untuk organ dari setiap hewan, kemudian diberi nomor kode hewan dan tanggal diseksi.

## 2. Teknik pengambilan fotoreseptor



(MEA Application Note: Retina Recordings Micro Electroretinograms from *Rattus norvegicus*, 2013 ; Kolb, H., 2012).

Gambar 4.2 Pengambilan Fotoreseptor pada Tikus

- a. Keluarkan jaringan mata pada tikus (Gambar A).
- b. Ambil fotoreseptor mata sepanjang ora serrata dengan gunting mata yang halus (Gambar B). Secara *sagittal section* untuk pembuatan preparat histologi retina (Gambar C)
- c. Transfer retina untuk dilakukan pewarnaan.

(MEA Application Note: Retina Recordings Micro Electroretinograms from *Rattus norvegicus*, 2013).

Setelah menyelesaikan prosedur pewarnaan, retina dipasang pada slide kaca untuk mikroskop cahaya (Mikroskop Nikon Microphot FX) dan video warna

Hitachi VK-C350, dan monitor video berwarna digunakan untuk pengukuran jaringan kapiler retina tikus dapat dibagi lagi ke lapisan atas, terhubung erat ke *arteriol precapillary*, dan lapisan yang lebih dalam, di dekat dengan *venula post capillary*. Kedua mata ini dievaluasi bersama, untuk masing-masing retina, tiga daerah konsentris dipisahkan dianalisis bagian pusat retina, yang didefinisikan sebagai lingkaran daerah sekitar saraf optik dengan radius setengah retina radius sampai tiga perempat dari jari-jari retina (Shen, J., Bi, Y. dan Das, U. N., 2014).

Analisis histologis retina bagian fotoreseptor diambil dan dilakukan dengan menggunakan pewarnaan Hx & E. Telah diamati bahwa pada ketebalan pada retina hewan yang diinduksi STZ dibandingkan dengan kontrol normal (Abdulrazaq, N. B. *et al.*, 2017).

### 3. Fiksasi kedua

Kantong yang berisi potongan organ dimasukkan dalam botol berisi larutan dapar formalin untuk difiksasi selama minimal 3 hari.

### 4. Pencucian

Kantong yang berisi potongan organ dimasukkan kedalam bak berisi air dan dialiri air secara terus-menerus minimal 6 jam. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan sisa formalin.

### 5. Proses dehidrasi

- a. Dehidrasi menggunakan alat dehidrasi otomatis.
- b. Disiapkan 8 buah bejana kaca dan diberi nomor pada masing-masing bejana sesuai arah jarum jam.

- c. Pada tiap bejana diisi larutan etanol 70% (no.1), 80% (no.2), 90% (no.3), etanol absolut I (no.4), etanol absolut II (no.5), xilen I (no.6), xilen II (no.7), xilen III (no.8).
  - d. Dimasukkan kristal  $\text{CuSO}_4$  pada bejana no.5 yang berguna sebagai indikator apakah organ sudah bebas dari airatur waktu perendaman masing-masing bejana yaitu: bejana no.1; 2; 3; 4; 5 dan 6 diatur selama 2,5 jam, bejana no.7; 1,5 jam, bejana no.8; 2 jam.
  - e. Hidupkan mesin untuk memulai proses dehidrasi
6. Pembuatan sediaan blok
- a. Siapkan beberapa cawan porselin dengan ukuran 9 x 5,5 x 1,5 cm, panaskan diatas api Bunsen.
  - b. Tuangkan parafin cair.
  - c. Masukkan potongan organ, atur sedemikian rupa sehingga permukaan organ menempel pada cawan porselin.
  - d. 1 cawan berisi 8-10 potongan organ.
  - e. Dibiarkan membeku.
  - f. Cawan direndam dalam air kira-kira 60 menit.
  - g. Simpan dalam lemari es 12 jam.
  - h. Blok parafin dikeluarkan dari cawan dan dipotong dengan ukuran 2 x 2 cm
  - i. Pemotongan organ.
  - j. Potongan organ dalam parafin dipotong menjadi sayatan tipis menggunakan mikrotom.
  - k. Organ dipotong agak tebal menggunakan pisau II.
  - l. Bila mengenai organ, pisau digeser ke pisau I.

- m. Lakukan pemotongan dengan ketebalan 5  $\mu\text{m}$ .
- n. Potongan diambil menggunakan stik bambu yang sebelumnya dibasahi air.
- o. Dimasukkan ke dalam bak berisi air sehingga mengambang.
- p. Tempelkan pada objek glass.
- q. Sayatan organ yang telah menempel pada objek glass diletakkan pada permukaan panas suhu (56 – 58) °C kurang lebih 10 detik.

#### 7. Pewarnaan Hematosiklin Eosin

- a. Bejana no. 1 dan 2 diisi xilen 100%, bejana 3 dan 4 diisi etanol absolut, bejana 5 dan 6 diisi etanol 80%, bejana 7 diisi etanol 70%.
- b. Atur tuas pengatur waktu pada mesin.
- c. Sediaan histopatologi diletakan dalam keranjang khusus.
- d. Hidupkan mesin.
- e. Sediaan pertama-tama direndam dalam bejana 1 dan 2 sambil digoyang selama 12 menit untuk proses deparafinasi.
- f. Dilakukan hidrasi dengan merendam preparat dalam etanol absolut selama 5 menit.
- g. Pindahkan ke dalam etanol 90%, 80%, 70% masing-masing 5 menit.
- h. Masukkan kedalam air mengalir selama 12 menit.
- i. Rendam dalam larutan Hematoksilin Mayer selama 5 menit.
- j. Cuci dengan air mengalir 2 X 12 menit.
- k. Pewarnaan eosin 0,25 % 12 menit.
- l. Dehidrasi pada etanol 70% sebanyak 8 kali, etanol 80%, etanol 90%, etanol absolut masing-masing 10 menit.
- m. Masukkan dalam xilen I, II, III 12 menit.

n. Tutup Objek Glass dengan cover glass.

o. Preparat siap diamati menggunakan Mikroskop  
(Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2014).

#### 4.5.7 Penanganan Hewan Coba Setelah Pembedahan

Tikus yang telah diambil organ yang akan diteliti dipastikan mati, bangkai tikus diletakkan dalam wadah baskom. Bangkai tikus percobaan dikubur di tanah dengan kedalaman minimal 50 cm dan luas lubang 0,25 m<sup>2</sup> dengan setiap lubang hanya digunakan untuk mengubur 10 tikus secara bersama, untuk mencegah bangkai tikus digali oleh hewan lain. Lubang ditutup kembali dengan tanah lalu lubang dipadatkan agar tidak tercium bau dari bangkai tikus tersebut.

#### 4.5.8 Pengamatan Preparat Fotoreseptor Retina

Melihat lapisan retina pada struktur fotoreseptor dengan menggunakan OptiLab dan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 x. Kemudian, diukur dengan satuan mikro.

### 4.6 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang pengolahannya menggunakan aplikasi SPSS 23.

#### a. Uji Univariat

Uji univariat dengan menggunakan statistik deskriptif yang menunjukkan hasil gambaran dari laboratorium untuk melihat fotoreseptor tikus putih (*Rattus Norvegicus*) strain wistar pada perbedaan perlakuan kontrol negatif.

#### b. Uji Bivariat

Uji ini untuk mengetahui perbedaan perlakuan secara keseluruhan terhadap kerusakan fotoreseptor dengan *one way* ANOVA, dengan didahului uji normalitas data-data penelitian dianalisis menggunakan uji normalitas. Data-data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis menggunakan uji normalitas

dengan metode *Shapiro-Wilk*, karena besar sampel yang digunakan  $\leq 50$ . Sebaran data dinilai normal jika  $p > 0,05$ . Jika di uji normalitas tidak menyimpulkan data normal, maka perlu dilakukan transformasi data dengan:

$$\text{Ln, log } X^2, X^3\sqrt{X} \text{ dll.}$$

Kemudian dilanjutkan kembali dengan uji normalitasnya. Jika hasil uji normalitasnya menunjukkan data normal maka dapat dilanjutkan dengan uji homogenitas. Apabila dari data transformasi tidak normal maka uji perbedaan menggunakan *Kruskal Wallis* ditambah *post hoc man withney*.

### 1. Uji Homogenitas

Uji homogenitas menggunakan uji varian Levene' test untuk mengetahui kehomogenan varian dari data-data yang diperoleh. Varian dinilai homogen jika  $p > 0,05$ .

### 2. Uji Anova

Jika data terdistribusi normal dan varian datanya homogen, maka pengujian dapat dilanjutkan dengan analisis varian 1 jalur. Secara umum, analisis varian ini dilakukan untuk mengetahui apakah tiap perlakuan berpengaruh pada hasil. Jika pada analisis varian diperoleh taraf signifikansi  $< 0,05$  yang berarti ada pengaruh berbagai dosis pemberian fraksi kloroform herba ciplukan (*Physalis angulate L.*) terhadap kerusakan fotoreseptor pada tikus putih yang diinduksi STZ.

### 3. Uji *Post Hoc*

Analisis *Post Hoc* dilakukan untuk mengetahui pasangan kelompok mana yang memiliki perbedaan fotoreseptor terhadap kerusakan pada tikus putih yang diinduksi STZ. Uji *Post-Hoc Bonferroni* digunakan apabila varian data

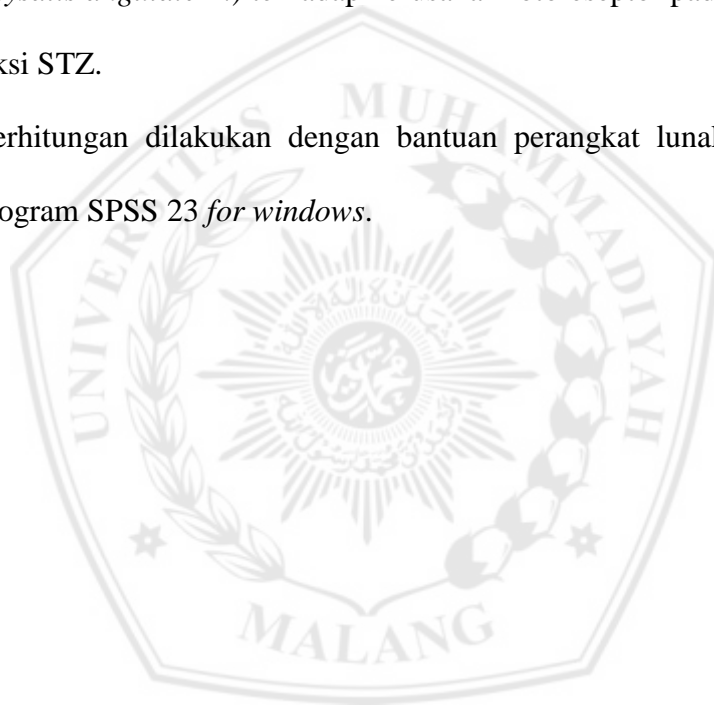


homogen dan sama sedangkan *Post-Hoc Tamhane* digunakan apabila varian data tidak homogen.

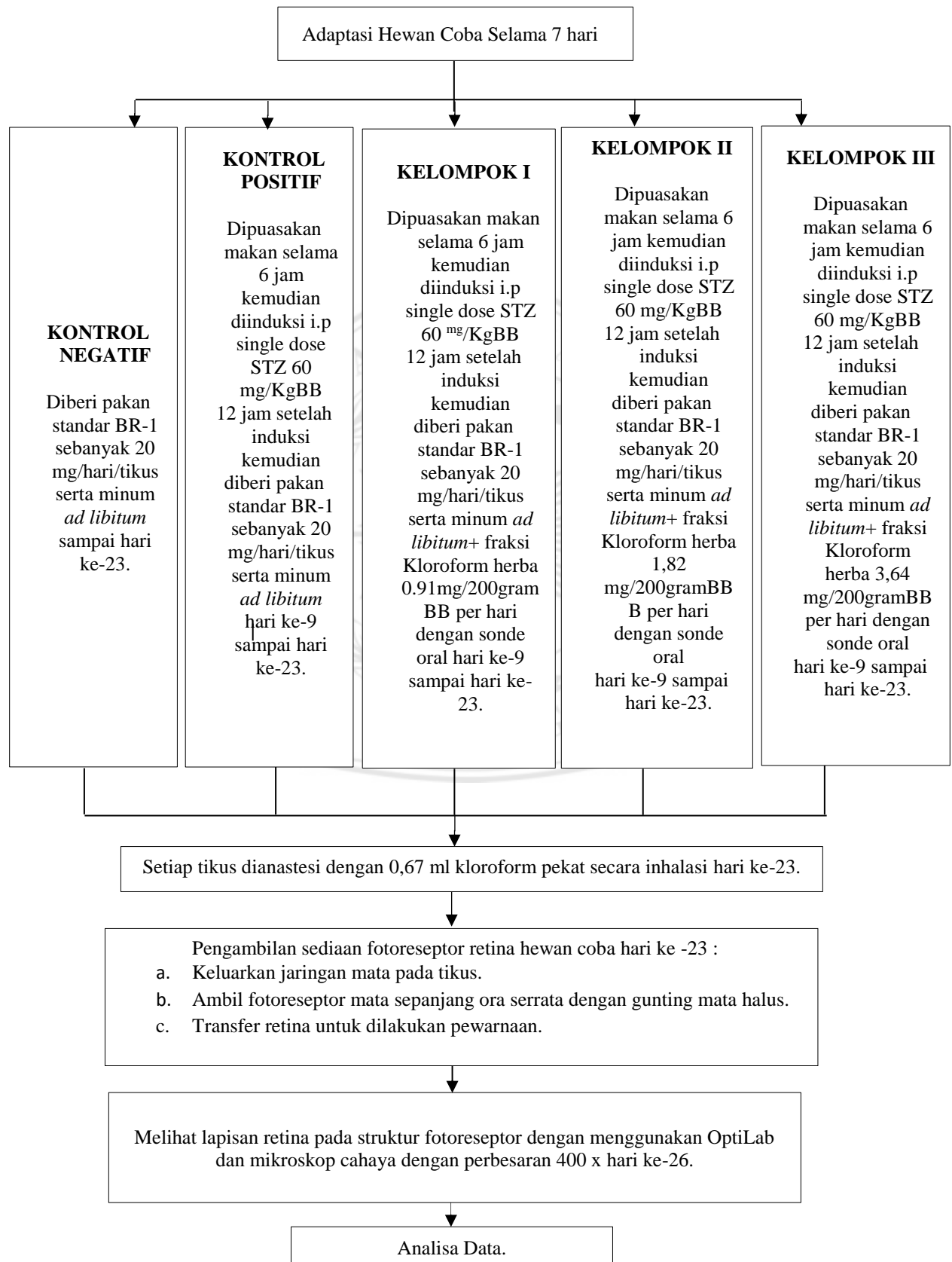
c. Uji Multivariat

Dilakukan uji regresi linier sederhana digunakan untuk mengetahui seberapa kuat pengaruh dan memprediksikan dosis pemberian fraksi kloroform herba ciplukan (*Physalis angulate L.*) terhadap kerusakan fotoreseptor pada tikus putih yang diinduksi STZ.

Proses perhitungan dilakukan dengan bantuan perangkat lunak (*software*) komputer program SPSS 23 *for windows*.



## 4.7 Alur Penelitian



Gambar 4.3 Bagan Alur Penelitian.

